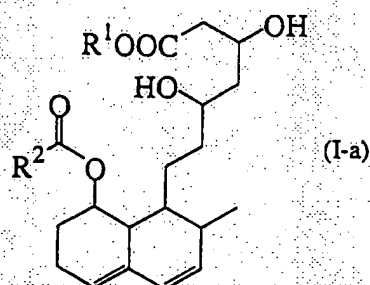




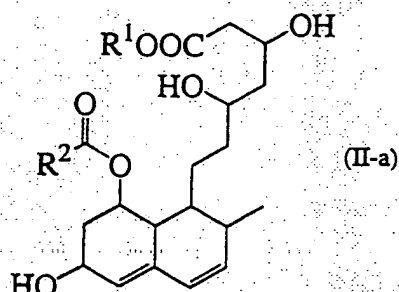
| | | |
|--|---|---|
| (51) 国際特許分類6 C12P 7/62, 17/06, C12N 1/20 | AI | (11) 国際公開番号 WO99/07872 (43) 国際公開日 1999年2月18日(18.02.99) |
| (21) 国際出願番号 PCT/JP98/03396 (22) 国際出願日 1998年7月30日(30.07.98) (30) 優先権データ 特願平9/213636 1997年8月7日(07.08.97) JP (71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 協和醗酵工業株式会社 (KYOWA HAKKO KOGYO CO., LTD.)[JP/JP] 〒100-8185 東京都千代田区大手町一丁目6番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人(米国についてののみ) 高野 裕(TAKANO, Yutaka)[JP/JP] 〒747-0025 山口県防府市美和町4-29 Yamaguchi, (JP) 長谷川勝(HASEGAWA, Masaru)[JP/JP] 〒194-0021 東京都町田市中町3-9-9 Tokyo, (JP) 森 英郎(MORI, Hideo)[JP/JP] 〒194-0022 東京都町田市森野4-14-8-103 Tokyo, (JP) 安藤勝彦(ANDO, Katsuhiko)[JP/JP] 〒194-0023 東京都町田市旭町1-17-8 Tokyo, (JP) 落合恵子(OCHIAI, Keiko)[JP/JP] 〒243-0431 神奈川県海老名市上今泉4-21-17 Kanagawa, (JP) | 本山裕章(MOTOYAMA, Hiroaki)[JP/JP] 〒225-0024 神奈川県横浜市青葉区市ヶ尾町51-5-211 Kanagawa, (JP) 尾崎明夫(OZAKI, Akio)[JP/JP] 〒194-0021 東京都町田市中町3-9-13 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AU, BG, BR, CA, CN, CZ, HU, IL, JP, KR, MX, NO, NZ, PL, RO, SG, SI, SK, UA, US, VN, ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). 添付公開書類 国際調査報告書 明細書とは別に規則13の2に基づいて提出された生物材料の寄託に関する表示 | |
| (54) Title: PROCESS FOR THE PREPARATION OF HMG-CoA REDUCTASE INHIBITORS (54) 発明の名称 HMG-CoAレダクターゼ阻害剤の製造法 (57) Abstract A process for the preparation of compounds represented by general formula (II-a) (wherein R ¹ is hydrogen, optionally substituted alkyl or alkali metal; and R ² is optionally substituted alkyl or aryl) or lactones (II-b) derived therefrom through ring closure, which comprises treating a compound resulting from a bacillus and represented by general formula (I-a) (wherein R ¹ and R ² are each as described above) or a lactone (I-b) derived therefrom through ring closure with an enzyme source having the activity of forming the compounds (II-a) or (II-b) from the compounds (I-a) or (I-b) in a reaction fluid to form the compound (II-a) or (II-b) in the reaction fluid, and recovering the compound (II-a) or (II-b) from the reaction fluid. <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;"> <p>(II-a)</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>(I-a)</p> </div> </div> | | |

(57)要約

バチルス属に属する微生物由来でかつ、一般式 (I-a)



(式中、R¹は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表し、R²は置換もしくは非置換のアルキルまたはアリールを表す) で表される化合物 [以下、化合物 (I-a) という] またはその閉鎖ラクトン体 [以下、化合物 (I-b) という] から、一般式 (II-a)



(式中、R¹は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表し、R²は置換もしくは非置換のアルキルまたはアリールを表す) で表される化合物 [以下、化合物 (II-a) という] またはその閉鎖ラクトン体 [以下、化合物 (II-b) という] を生成する活性を有する酵素源を、化合物 (I-a) または化合物 (I-b) に反応液中で作用させ、反応液中に化合物(II-a)または化合物 (II-b) を生成させ、該反応液から化合物(II-a)または化合物 (II-b) を採取することを特徴とする化合物(II-a)または化合物 (II-b) の製造法。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

| | | | | | | | |
|----|--------------|----|-----------|----|-------------------|----|------------|
| AL | アルバニア | FI | フィンランド | LK | スリ・ランカ | SI | スロヴェニア |
| AM | アルメニア | FR | フランス | LR | リベリア | SK | スロヴァキア |
| AT | オーストリア | GA | ガボン | LS | レソト | SL | シエラ・レオネ |
| AU | オーストラリア | GB | 英国 | LT | リトアニア | SN | セネガル |
| AZ | アゼルバイジャン | GD | グレナダ | LU | ルクセンブルグ | SZ | スワジランド |
| BA | ボスニア・ヘルツェゴビナ | GE | グルジア | LV | ラトヴィア | TD | チャード |
| BB | バルバドス | GH | ガーナ | MC | モナコ | TG | トーゴ |
| BE | ベルギー | GM | ガンビア | MD | モルドヴァ | TJ | タジキスタン |
| BF | ブルキナ・ファソ | GN | ギニア | MG | マダガスカル | TM | トルクメニスタン |
| BG | ブルガリア | GW | ギニア・ビサウ | MK | マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国 | TR | トルコ |
| BJ | ベナン | GR | ギリシャ | ML | マリ | TT | トリニダード・トバゴ |
| BR | ブラジル | HR | クロアチア | MN | モンゴル | UA | ウクライナ |
| BY | ベラルーシ | HU | ハンガリー | MR | モーリタニア | UG | ウガンダ |
| CA | カナダ | ID | インドネシア | MW | マラウイ | US | 米国 |
| CF | 中央アフリカ | IE | アイルランド | MX | メキシコ | UZ | ウズベキスタン |
| CG | コンゴ | IL | イスラエル | NE | ニジェール | VN | ヴェトナム |
| CH | スイス | IN | インド | NL | オランダ | YU | ユーゴスラビア |
| CI | コートジボアール | IS | アイスランド | NO | ノルウェー | ZW | ジンバブエ |
| CM | カメルーン | IT | イタリア | NZ | ニュージーランド | | |
| CN | 中国 | JP | 日本 | PL | ポーランド | | |
| CU | キューバ | KE | ケニア | PT | ポルトガル | | |
| CY | キプロス | KG | キルギスタン | RO | ルーマニア | | |
| CZ | チェコ | KP | 北朝鮮 | RU | ロシア | | |
| DE | ドイツ | KR | 韓国 | SD | スーダン | | |
| DK | デンマーク | KZ | カザフスタン | SE | スウェーデン | | |
| EE | エストニア | LC | セントルシア | SG | シンガポール | | |
| ES | スペイン | LI | リヒテンシュタイン | | | | |

明 細 書

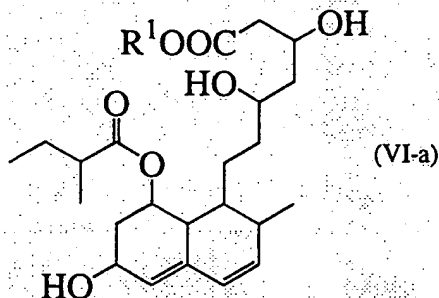
HMG-C o A レダクターゼ阻害剤の製造法

技術分野

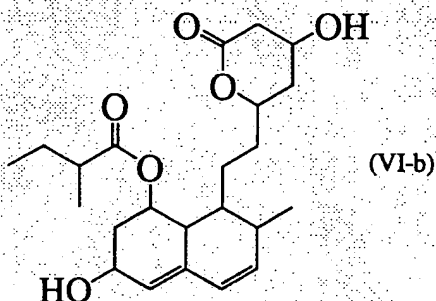
本発明は、ヒドロキシメチルグルタリルC o A レダクターゼ（以下、HMG-C o A レダクターゼと略記する。）を阻害し、血清コレステロールの低下作用等を有する化合物の製造法に関する。

背景技術

一般式 (VI-a)

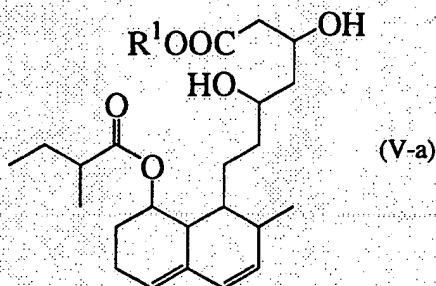


（式中、R¹は水素原子またはアルカリ金属を表す）で表される化合物〔以下、化合物(VI-a)という〕または一般式 (VI-b)

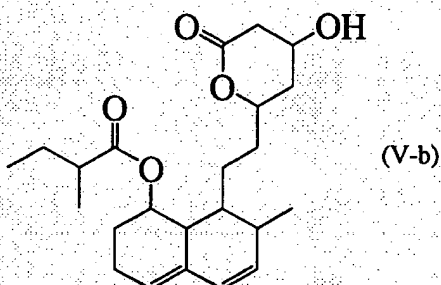


で表される、化合物 (VI-a) の閉鎖ラクトン体〔以下、化合物 (VI-b)という〕は、HMG-C o A レダクターゼを阻害し、血清コレステロールの低下作用等を示すことが知られている〔ザ・ジャーナル・オブ・アンチビオチクス (The Journal of Antibiotics) 29, 1346(1976)〕。

一般式 (V-a)



(式中、R¹は水素原子またはアルカリ金属を表す) で表される化合物 [以下、化合物 (V-a) という] または一般式 (V-b)



で表される、化合物 (V-a) の閉鎖ラクトン体 [以下、化合物 (V-b) という] から化合物 (VI-a) または化合物 (VI-b) を生成させる能力を有する微生物としては、アブシディア (Absidia) 属、カニンガメラ (Cunninghamella) 属、シンセファラスポラム (Syncephalasporum) 属およびストレプトマイセス

(Streptomyces) 属に属する微生物 (特開昭 57-50894 号公報)、アクチノムコール (Actinomucor) 属、シルシネラ (Circinella) 属、ゴングロネラ

(Gongronella) 属、モルティエレラ (Mortierella) 属、ムコール (Mucor) 属、フィコミセス (Phycomyces) 属、リゾパス (Rhizopus) 属、シンセファラストラム (Syncephalastrum) 属、ザイゴラインチュス (Zygorhynchus) 属、ピクノポラス (Pycnoporus) 属、リゾクトニア (Rhizoctonia) 属およびノカルディア

(Nocardia) 属に属する微生物 [ザ・ジャーナル・オブ・アンチビオチクス (The Journal of Antibiotics), 36, 887 (1983)]、アミコラータ

(Amycolata) 属、サッカロポリスポーラ (Saccharopolyspora) 属、アミコラトプシス (Amycolatopsis) 属およびサッカロスリックス (Saccharothrix) 属に属

する微生物（特開平 7-184670 号公報）並びにアクチノマデュラ

（*Actinomadura*）属に属する微生物（WO 96/40863）が知られている。

上記の微生物は放線菌または糸状菌に属している。本発明のごとく、細菌に属し、上記化合物（V-a）または化合物（V-b）からそれぞれ、化合物（VI-a）または化合物（VI-b）を生成する能力を有する微生物は知られていない。放線菌や糸状菌は細菌に比べて増殖が遅いため、反応に必要な菌体量を取得するのに時間がかかるという欠点がある。また、放線菌や糸状菌は発酵槽での培養管理が難しいという問題点もある。放線菌や糸状菌は菌糸を伸ばして増殖するため、発酵槽で増殖させると培養液の粘度が上昇する。このため酸素が不足しやすく、培養液が不均一になるため反応効率の低下を招きやすい。この酸素不足を解消し、培養液を均一に保つためには、発酵槽の攪拌速度を上げなければならないが、攪拌速度を上げると菌糸が剪断され、微生物の活性が低下しやすい〔発酵工学の基礎、p169～190, P.F. Stansbury, A. Whitakaer 著、学会出版センター（1988）〕。このように放線菌や糸状菌は培養を行なう上で問題があるが、細菌は菌糸を形成しないため、培養液の粘度は上がりにくく、通気不足や培養液が不均一になることは少なく、培養管理が容易である。

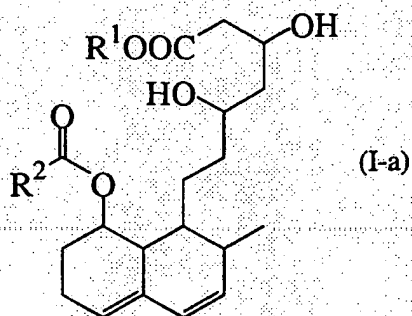
遺伝子組換え技術で、遺伝子を大腸菌等の細菌で発現させることはよく行われているが、放線菌や糸状菌の遺伝子はアミノ酸を規定するコドンが大腸菌等の細菌と大きく異なるため、効率よく発現することは一般に難しい。

放線菌で遺伝子を高発現するためのベクター、プロモーター等の材料は限られており、遺伝子を高発現し、より効率よく反応を行なうためにはベクター、プロモーター等が数多く利用できる細菌を用いることが望ましい。細菌の遺伝子であれば容易に細菌で高発現することができる。

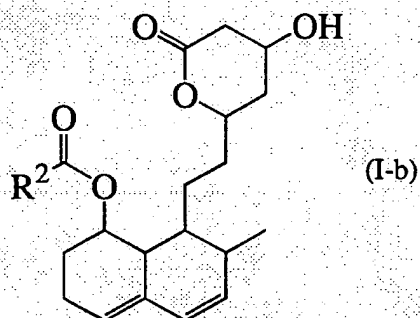
発明の開示

本発明の目的は、HMG-CoA レダクターゼを阻害し、血清コレステロールの低下作用等を有する化合物の製造法を提供することにある。

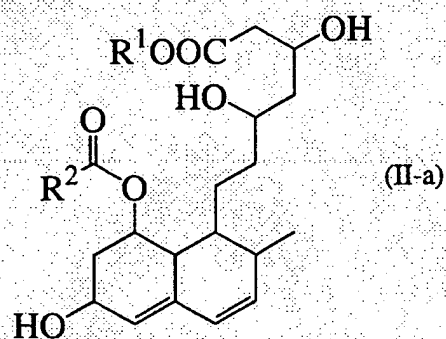
本発明は、バチルス属に属する微生物由来でかつ、一般式（I-a）



(式中、 R^1 は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表し、 R^2 は置換もしくは非置換のアルキルまたはアリールを表す)で表される化合物〔以下、化合物 (I-a) という〕または一般式 (I-b)

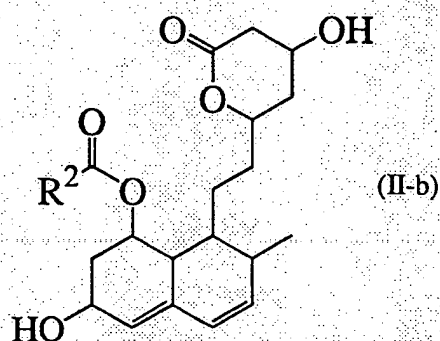


(式中、 R^2 は置換もしくは非置換のアルキルまたはアリールを表す)で表される、化合物 (I-a) の閉鎖ラクトン体〔以下、化合物 (I-b) という〕から、一般式 (II-a)



(式中、 R^1 は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表し、 R^2 は置換もしくは非置換のアルキルまたはアリールを表す)で表される化合物〔以下、化合物 (II-a) という〕または一般式 (II-b)

5



(式中、R²は置換もしくは非置換のアルキルまたはアリールを表す)で表される、化合物(II-a)の閉鎖ラクトン体[以下、化合物(II-b)という]を生成する活性を有する酵素源を、化合物(I-a)または化合物(I-b)に反応液中で作用させ、反応液中に化合物(II-a)または化合物(II-b)を生成させ、該反応液から化合物(II-a)または化合物(II-b)を採取することを特徴とする化合物(II-a)または化合物(II-b)の製造法に関する。

アルキルとしては、直鎖または分岐状の、炭素数1～10、好ましくは1～6のアルキルであり、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、ペンチル、ネオペンチル、ヘキシル、イソヘキシル、ヘプチル、4,4-ジメチルペンチル、オクチル、2,2,4-トリメチルペンチル、ノニル、デシル、これら各種分岐鎖異性体等があげられる。

アリールとしては、フェニル、ナフチル等があげられる。

置換アルキルにおける置換基としては、ハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、アルコキシ、アリール等があげられる

置換アリールにおける置換基としては、ハロゲン、ヒドロキシ、アミノ、アルキル、アルコキシ等があげられる。

アルコキシにおけるアルキル部分は上述のアルキルと同義である。

アルカリ金属とは、リチウム、ナトリウム、カリウム、ルビジウム、セシウム、フランシウムの各元素を表す。

本発明で用いられる酵素源は、バチルス属に属する微生物由来であって、化合物(I-a)または化合物(I-b)から、それぞれ化合物(II-a)または化合物(II-

b) を生成する活性を有する酵素源であれば、バチルス属に属し、化合物 (I-a) または化合物 (I-b) から、化合物(II-a)または化合物 (II-b) を生成する活性を有する微生物、該微生物の培養物もしくは菌体またはそれらの処理物、該微生物から抽出した酵素等いずれでも用いられる。

バチルス属に属し、化合物 (I-a) または化合物 (I-b) から、化合物(II-a)または化合物 (II-b) を生成する活性を有する微生物としては、例えば、バチルス・ラテロスポラス (Bacillus laterosporus)、バチルス・バディウス (Bacillus badius)、バチルス・ブレビス (Bacillus brevis)、バチルス・アルベイ (Bacillus alvei)、バチルス・サーキュランス (Bacillus circulans)、バチルス・マセランス (Bacillus macerans)、バチルス・メガテリウム (Bacillus megaterium)、バチルス・プミルス (Bacillus pumilus)、バチルス・サチルス (Bacillus subtilis) に属する微生物等があげられる。

さらに具体的には、バチルス・ラテロスポラス (Bacillus laterosporus) ATCC4517株、バチルス・バディウス (Bacillus badius) ATCC14574株、バチルス・ブレビス (Bacillus brevis) NRRL B-8029株、バチルス・エスピー (Bacillus sp.) PV-6株、バチルス・エスピー (Bacillus sp.) PV-7株、バチルス・アルベイ (Bacillus alvei) ATCC6344株、バチルス・サーキュランス (Bacillus circulans) NTCT-2610株、バチルス・マセランス (Bacillus macerans) NCIB-9368株、バチルス・メガテリウム (Bacillus megaterium) ATCC10778株、バチルス・メガテリウム ATCC11562株、バチルス・メガテリウム ATCC13402株、バチルス・メガテリウム ATCC15177株、バチルス・メガテリウム ATCC15450株、バチルス・メガテリウム ATCC19213株、バチルス・メガテリウム IAM1032株、バチルス・プミルス (Bacillus pumilus) FERM BP-2064株またはバチルス・サチルス (Bacillus subtilis) ATCC6051株等の微生物があげられる。

また、これらの微生物の継代培養体、突然変異体もしくは誘導体、遺伝子組換え技術により製造した組み換え体等も用いられる。バチルス・エスピー PV-6株及びPV-7株は、本発明者によって土壌より新たに分離された菌株であり、それらの菌学的性質は以下の通りである。

PV-6株

(A) 形態的性質

1. 細胞の形；桿状、大きさ； $0.8 \sim 1.2 \times 2.0 \sim 4.0 \mu\text{m}$
2. 細胞の多形性の有無；無
3. 運動性の有無；無
4. 胞子の有無；観察されない

(B) 培養的性質

肉汁寒天平板培地及び肉汁液体培地における培養的性質を以下に示す。

1. 肉汁寒天平板培養（1～2日間培養）

- 1) 生育の様相；良好
- 2) 色；クリーム
- 3) 光沢；有
- 4) 拡散性色素；無

2. 肉汁液体培養（1～2日間培養）

- 1) 表面生育；無
- 2) 濁度；有

3. 肉汁ゼラチン穿刺培養

- 1) 生育の状態；良好
- 2) ゼラチンの液化；有

4. リトマスーミルク反応

- 1) 反応；アルカリ
- 2) 凝固；無
- 3) 液化；無

(C) 生理学的性質

1. グラム染色性；陽性あるいは陰性
2. 硝酸塩の還元；陰性
3. 脱窒反応；陽性
4. MRテスト；陰性

5. VPテスト；陰性
6. インドールの生成；陰性
7. 硫化水素の生成；陽性
8. デンプンの加水分解；陰性
9. クエン酸の利用；陽性
10. 無機窒素源の利用
 - 1) 硝酸塩；陰性
 - 2) アンモニウム塩；陽性
11. 色素の生成；無
12. ウレアーゼ；陽性
13. オキシダーゼ；陰性
14. カタラーゼ；陽性
15. 生育の範囲
 - 1) 生育pH範囲；pH 6～pH 9（最適生育 pH 7付近）
 - 2) 生育温度範囲；6℃～40℃（最適生育温度；30℃付近）
16. 酸素に対する態度；好気性
17. O-Fテスト；酸化的
18. 酸の生成（好氣的条件）

+ は生成することを、- は生成しないことをそれぞれ示す。

 - (1) L-アラビノース；-
 - (2) D-キシロース；-
 - (3) D-グルコース；+
 - (4) D-マンノース；-
 - (5) D-フラクトース；+
 - (6) D-ガラクトース；-
 - (7) マルトース；-
 - (8) シュクロース；-
 - (9) ラクトース；-

- (10)トレハロース；-
- (11)D-ソルビトール；-
- (12)D-マンニトール；+
- (13)イノシトール；-
- (14)グリセリン；+
- (15)デンプン；-

(D) 化学分類学的性質

1. DNA の塩基組成 (G+C mol%) ; 39.1
2. 菌体脂質：
主要キノン；MK-7
主要脂肪酸；anteiso- $C_{15:0}$ 、iso- $C_{15:0}$
3. 細胞壁ペプチドグリカン ジアミノ酸組成；meso-A₂pm

本菌株は、陽性あるいは陰性のグラム染色性を示す好気性桿状細菌で、内生孢子を形成し、運動性はなく、カタラーゼ活性は陽性をオキシダーゼ活性は陰性を示し、ウレアーゼ活性が陽性で、グルコースから酸を生成した。10℃で生育したが50℃以上では生育しなかった。化学分類学的性質として、主要キノンはメナキノン-7で、主要脂肪酸はアンテイソ $C_{15:0}$ とイソ $C_{15:0}$ であり、細胞壁ペプチドグリカンのジアミノ酸組成はメソジアミノピメリン酸で、DNAのGC含量は39.1 mol%であった。

以上の微生物学的性質を有する菌株の分類学的位置について、バージェイズ・マニュアル・システムティック・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology)、vol.2、(1986)の記載と照合した結果、本菌株は、バチルス (Bacillus) 属関連細菌と推定された。さらに、16S rRNAの塩基配列を、バチルス (Bacillus) 属とその関連属の塩基配列を対照にして近隣結合法により分子系統解析を行なった結果、本菌は図1に示すように、バチルス (Bacillus) 群にクラスタリングされた。以上の結果より、本菌株をバチルス (Bacillus) 属に属する細菌と同定し、バチルス・エスピー PV-6 株 (Bacillus sp. PV-6) と命名した。

PV-7株

(A) 形態的性質

1. 細胞の形；桿状、大きさ； $1.0 \times 2.0 \sim 3.0 \mu\text{m}$
2. 細胞の多形性の有無；無
3. 運動性の有無；無
4. 胞子の有無；有

(B) 培養的性質

肉汁寒天平板培地及び肉汁液体培地における培養的性質を以下に示す。

1. 肉汁寒天平板培養（1～2日間培養）

- 1) 生育の様相；良好
- 2) 色；アイボリー
- 3) 光沢；無
- 4) 拡散性色素；無

2. 肉汁液体培養（1～2日間培養）

- 1) 表面生育；有
- 2) 濁度；有

3. 肉汁ゼラチン穿刺培養

- 1) 生育の状態；良好
- 2) ゼラチンの液化；有

4. リトマスーミルク反応

- 1) 反応；アルカリ
- 2) 凝固；無
- 3) 液化；無

(C) 生理学的性質

1. グラム染色性；陽性あるいは陰性
2. 硝酸塩の還元；コハク酸培地で陽性
3. 脱窒反応；陰性
4. MRテスト；陰性

5. VPテスト；陰性
6. インドールの生成；陰性
7. 硫化水素の生成；疑わしい
8. デンプンの加水分解；陰性
9. クエン酸の利用；陽性
10. 無機窒素源の利用
 - 1) 硝酸塩；陽性
 - 2) アンモニウム塩；陽性
11. 色素の生成；無
12. ウレアーゼ；陽性
13. オキシダーゼ；陰性
14. カタラーゼ；陽性
15. 生育の範囲
 - 1) 生育pH範囲；pH 6～pH 10（最適生育 pH 7付近）
 - 2) 生育温度範囲；11℃～47℃（最適生育温度；30℃付近）
16. 酸素に対する態度；好気性
17. O-Fテスト；酸化的
18. 酸の生成（好氣的条件）

+ は生成することを、- は生成しないことを、W は弱く生成することをそれぞれ示す。

- (1) L-アラビノース；+
- (2) D-キシロース；W
- (3) D-グルコース；+
- (4) D-マンノース；W
- (5) D-フラクトース；W
- (6) D-ガラクトース；-
- (7) マルトース；W
- (8) シュクロース；+

- (9) ラクトース ; -
- (10) トレハロース ; w
- (11) D-ソルビトール ; +
- (12) D-マンニトール ; +
- (13) イノシトール ; w
- (14) グリセリン ; +
- (15) デンプン ; w

(D) 化学分類学的性質

1. DNA の塩基組成 (G+C mol%) ; 37.9
2. 菌体脂質 :
 - 主要キノン ; MK-7
 - 主要脂肪酸 ; anteiso-C_{15:0}、anteiso-C_{17:0}
3. 細胞壁ペプチドグリカン ジアミノ酸組成 ; meso-A₂pm

本菌株は、陽性あるいは陰性のグラム染色性を示す好気性桿状細菌で、内生孢子を形成し、運動性はなく、カタラーゼ活性は陽性を、オキシダーゼ活性は陰性を示し、ウレアーゼ活性が陽性で、グルコースから酸を生成した。11℃で生育したが47℃以上では生育しなかった。化学分類学的性質として、主要キノンはメナキノン-7で、主要脂肪酸はアンテイソ-C_{15:0}とアンテイソ-C_{17:0}であり、細胞壁ペプチドグリカンのジアミノ酸組成はメソジアミノピメリン酸で、DNAのGC含量は37.9 mol%であった。以上の微生物学的性質を有する菌株の分類学的位置について、バージェイズ・マニュアル・システムティック・バクテリオロジー (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology) vol.2、(1986) の記載と照合した結果、本菌株は、バチルス (Bacillus) 属関連細菌と推定された。

さらに、16S rRNAの塩基配列を、バチルス (Bacillus) 属とその関連属の塩基配列を対照にして近隣結合法により分子系統解析を行った結果、本菌は図1に示すように、バチルス (Bacillus) 群にクラスタリングされた。以上の結果より、本菌株をバチルス (Bacillus) 属に属する細菌と同定し、バチルス・エスピー PV-7株(Bacillus sp. PV-7)と命名した。

バチルス・エスピー PV-6株およびPV-7株は、平成9年7月30日付けで日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号（郵便番号305-0046）通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所にそれぞれFERM BP-6029およびFERM BP-6030として寄託されている。

本発明に用いられる微生物の培養に用いられる培地は、本発明の微生物が資化することができる炭素源、窒素源、無機塩類等を含有し、本発明の微生物の培養を効率的に行なえる培地であれば、天然培地、合成培地のいずれでも用いられる。培地中の炭素源の具体例としては、グルコース、フラクトース、グリセロール、マルトース、スターチ、サッカロース、酢酸、クエン酸等の有機酸、糖蜜等があげられる。

窒素源の具体例としては、アンモニア、塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、酢酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、リン酸アンモニウム等の各種無機酸や有機酸のアンモニウム塩、ペプトン、肉エキス、コーンスティープリカー、カゼイン加水分解物、大豆ミール、ファーマメディア、魚ミール、各種発酵菌体およびその消化物等があげられる。

無機物の具体例としては、リン酸第一カリウム、リン酸第二カリウム、リン酸マグネシウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、硫酸第一鉄、硫酸マンガン、硫酸銅、炭酸カルシウム等があげられる。

また、必要に応じてチアミン、ビオチン等のビタミン類、グルタミン酸、アスパラギン酸等のアミノ酸、アデニン、グアニン等の核酸関連物質等を添加してもよい。

本発明に用いられる微生物の培養は、振盪培養、通気攪拌培養等の好气的条件下で行うことが好ましい。通気攪拌培養の場合は、発泡を防ぐため消泡剤を適量添加するのが好ましい。培養は通常20～40℃、好ましくは28～34℃で、8～120時間行う。培養中pHは6.0～10.0、好ましくはpH 6.0～7.0に保持する。pHの調整は無機酸あるいは有機酸、アルカリ溶液、尿素、炭酸カルシウム、アンモニア等を用いて行う。

このようにして得られる微生物、該微生物の培養物もしくは菌体またはそれら

の処理物、該微生物から抽出した酵素等を本発明の酵素源として用いる。処理物としては、菌体の乾燥物、凍結乾燥物、界面活性剤処理物、酵素処理物、超音波処理物、機械的磨砕処理物、溶媒処理物等の菌体処理物、菌体の蛋白分画物、菌体及び菌体処理物の固定化物等があげられる。

化合物 (I-a) または化合物 (I-b) から化合物 (II-a) または化合物 (II-b) への変換方法は、微生物を培養する培地に予め化合物 (I-a) または化合物 (I-b) を添加する方法を用いてもよいし、培養中に化合物 (I-a) または化合物 (I-b) を添加する方法を用いてもよい。また、微生物を培養して得られた酵素源を、化合物 (I-a) または化合物 (I-b) に反応液中で作用させる方法を用いてもよい。

化合物 (I-a) または化合物 (I-b) を微生物を培養する培地中に添加する場合、化合物 (I-a) または化合物 (I-b) は培地 1 ml 当たり 0.1 ~ 3 mg、好ましくは 0.2 ~ 1 mg を培養の初発または途中に添加する。化合物 (I-a) または化合物 (I-b) は、水またはメチルアルコール、エチルアルコール等の有機溶媒に溶解したのち培地に添加することが望ましい。

微生物を培養して得られた酵素源を、化合物 (I-a) または化合物 (I-b) に反応液中で作用させる方法を用いる場合、用いる酵素源の量は、当該酵素源の比活性等により異なる。例えば、酵素源として微生物の培養物もしくは菌体またはそれらの処理物を用いる場合は、化合物 (I-a) または化合物 (I-b) 1 mg 当たり 5 ~ 1000 mg、好ましくは 10 ~ 400 mg 添加する。反応は、反応液中 20 ~ 40 °C で行うことが好ましく、とくに 28 ~ 34 °C で行うことが好ましい。反応時間は用いる酵素源の量および比活性等により異なるが、通常 2 ~ 150 時間、好ましくは、72 ~ 120 時間である。

反応液としては、水もしくは水性媒体、有機溶媒または、水もしくは水性媒体と有機溶媒との混合液が用いられる。水性媒体としては、例えばリン酸緩衝液、HEPES (N-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N-エタンスルホン酸) 緩衝液、トリス [(トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン)] 塩酸緩衝液等の緩衝液が用いられる。有機溶媒としては反応を阻害しないものであればいずれでもよく、例えば、アセトン、酢酸エチル、ジメチルスルホキシド、キシレン、メチルアルコ

ール、エチルアルコール、ブタノール等が用いられる。有機溶媒または水もしくは水性媒体と有機溶媒との混合液は、例えば化合物 (I-b) を用いる場合好ましく用いられる。

化合物 (I-a) または化合物 (I-b) を反応液に添加する場合、化合物 (I-a) または化合物 (I-b) を溶解することができる水もしくは水性媒体、有機溶媒、または水もしくは水性媒体と有機溶媒との混合液に溶解し、反応液に添加する。有機溶媒としては、反応を阻害しないものであればいずれでもよく、例えば、アセトン、酢酸エチル、ジメチルスルホキシド、キシレン、メチルアルコール、エチルアルコール、ブタノール等が用いられる。

化合物 (I-b) および化合物 (II-b) は下記に例示するラクトンの開環方法により、容易に化合物 (I-a) および化合物 (II-a) にそれぞれ変換することができる。また、化合物 (I-a) および化合物 (II-a) は下記に例示するラクトンの生成方法により容易に化合物 (I-b) および化合物 (II-b) に変換することができる。

ラクトンの開環方法としては、化合物 (I-b) または化合物 (II-b) を水性媒体に溶解し、酸またはアルカリを添加し開環する方法があげられる。水性媒体としては、例えば水、リン酸緩衝液、トリス緩衝液など反応を阻害しない塩類を含む水溶液があげられる。該水溶液中には、反応を阻害しない濃度のメタノール、エタノール、酢酸エチルなどの有機溶媒を含んでいてもよい。酸としては酢酸、塩酸、硫酸などの酸があげられ、アルカリとしては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、アンモニアなどがあげられる。

ラクトンの生成方法としては、化合物 (I-a) または化合物 (II-a) を非水系の溶媒に溶解し、酸または塩基触媒を添加しラクトンを形成せる方法があげられる。非水系の溶媒としては実質的に水を含まない有機溶媒で化合物 (I-a) または化合物 (II-a) を溶解できるものならばいかなるものでも用いることができる。溶媒としては、たとえばジクロロメタン、クロロホルム、酢酸エチルなどがあげられる。触媒としては、ラクトン化反応を触媒し、基質や反応産物にラクトン化以外の作用をおよぼさないものならば、どのようなものでも使用でき

る。該触媒としては、トリフルオロ酢酸やパラトルエンスルホン酸などがあげられる。反応温度は特に制限はないが、0～100℃が好ましく、20～80℃が特に好ましい。

本発明において化合物(II-a)は、化合物(I-a)に上述の酵素源を作用させて得ることができるが、化合物(I-b)を上述のラクトンの開環方法を行い化合物(I-a)に変換した後上述の酵素源を作用させて得ることもできるし、また、化合物(I-b)に上述の酵素源を作用させて化合物(II-b)を生成させた後上述のラクトンの開環方法を行うことで得ることもできる。

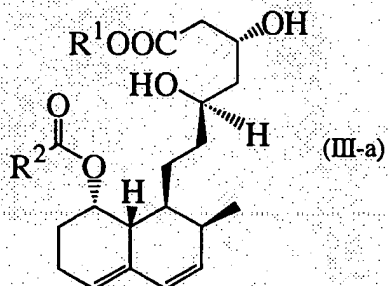
同様に、化合物(II-b)は、化合物(I-b)に上述の酵素源を作用させて得ることができるが、化合物(I-a)を上述のラクトンの生成方法を行い化合物(I-b)に変換した後上述の酵素源を作用させて得ることもできるし、また、化合物(I-a)に上述の酵素源を作用させて化合物(II-a)を生成させた後上述のラクトンの生成方法を行うことで得ることもできる。

反応溶液からの化合物(II-a)または化合物(II-b)の採取は、通常の有機合成化学で用いられる方法、例えば、有機溶媒による抽出、結晶化、薄層クロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー等により行うことができる。

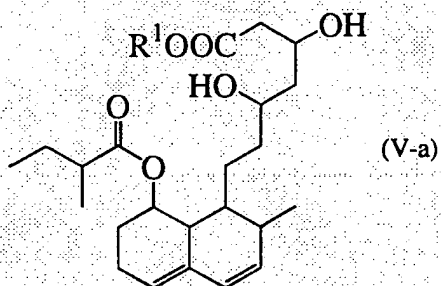
本発明により得られる化合物(II-a)または化合物(II-b)の確認または定量方法は、化合物(II-a)または化合物(II-b)を確認または定量できる方法であれば、いずれの方法でも用いられるが、例えば、¹³C-NMRスペクトル、¹H-NMRスペクトル、マススペクトル、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)等の方法により行うことができる。

本発明において、化合物(I-a)、化合物(I-b)、化合物(II-a)および化合物(II-b)の中には、光学異性体等の立体異性体が存在し得るものもあるが、本発明は、これらを含め、全ての可能な異性体およびそれらの混合物を包含する。

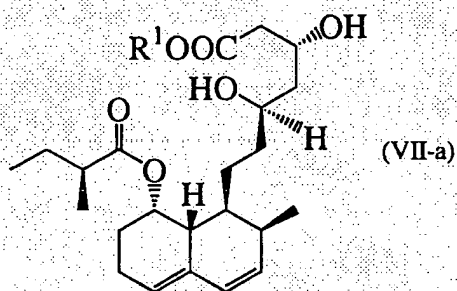
化合物(I-a)としては、一般式(III-a)



(式中、R¹は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表し、R²は置換もしくは非置換のアルキルまたはアールを表す) で表される化合物 [以下、化合物(III-a) という] が好ましく、一般式 (V-a)

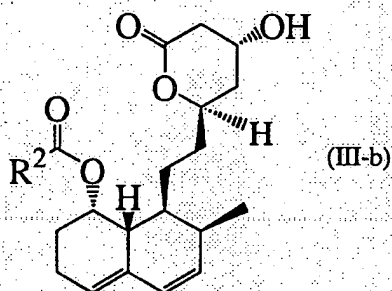


(式中、R¹は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表す) で表される化合物 [以下、化合物(V-a) という] がより好ましく、一般式 (VII-a)

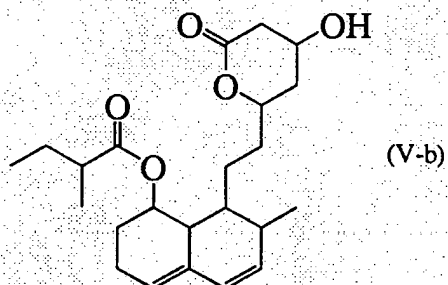


(式中、R¹は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表す) で表される化合物 [以下、化合物(VII-a) という] が特に好ましい。

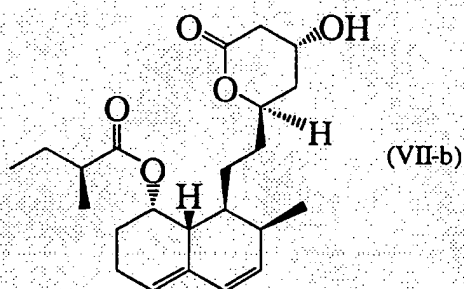
化合物 (I-b) としては、一般式(III-b)



(式中、 R^2 は置換もしくは非置換のアルキルまたはアリールを表す)で表される化合物〔以下、化合物(III-b)という〕が好ましく、一般式(V-b)

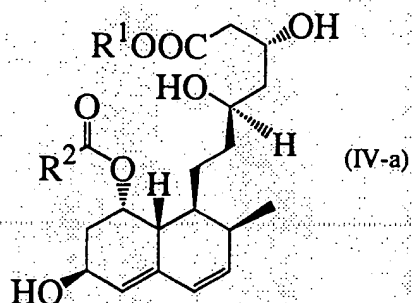


で表される化合物〔以下、化合物(V-b)という〕がより好ましく、一般式(VII-b)

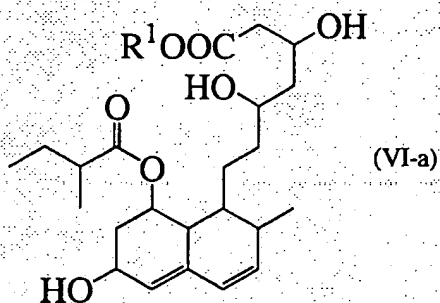


で表される化合物〔以下、化合物(VII-b)という〕が特に好ましい。

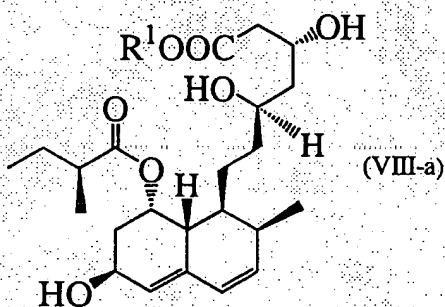
化合物(II-a)としては、一般式(IV-a)



(式中、R¹は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表し、R²は置換もしくは非置換のアルキルまたはアリールを表す) で表される化合物〔以下、化合物(IV-a) という〕が好ましく、一般式 (VI-a)

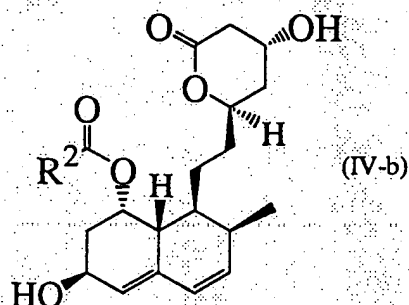


(式中、R¹は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表す) で表される化合物〔以下、化合物(IV-a) という〕がより好ましく、一般式 (VIII-a)

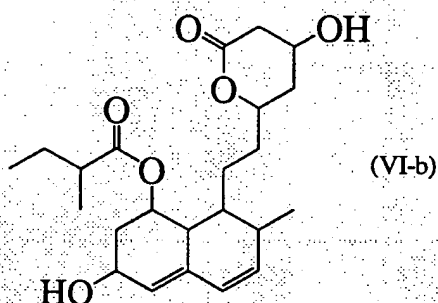


(式中、R¹は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表す) で表される化合物〔以下、化合物(VIII-a) という〕が特に好ましい。

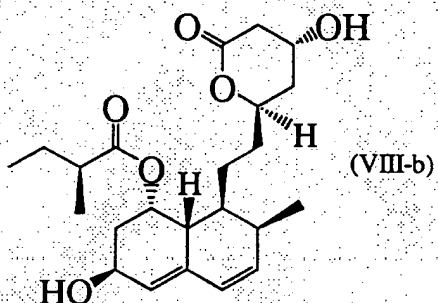
化合物 (II-b) としては、一般式(IV-b)



(式中、 R^2 は置換もしくは非置換のアルキルまたはアリールを表す)で表される化合物〔以下、化合物(IV-b) といふ〕が好ましく、一般式 (VI-b)



で表される化合物〔以下、化合物(VI-b) といふ〕がより好ましく、一般式 (VIII-b)



で表される化合物〔以下、化合物(VIII-b) といふ〕が特に好ましい。

図面の簡単な説明

図1は、16SrRNA 塩基配列を元にしたバチルス・エスピー (*Bacillus* sp.) PV-6株およびバチルス・エスピー (*Bacillus* sp.) PV-7菌株の近隣結合法による分子系統解析を示す。

以下に本発明の実施例を示す。

発明を実施するための最良の形態

実施例 1

化合物 (VII-b) (シグマ社製) 100mgを9.5mlのメタノールに溶解した後、1N水酸化ナトリウム0.5mlを加えて室温で1時間振とうした。得られた反応液を乾固し脱イオン水5mlを加えて溶解し1N塩酸約0.1mlでpHを約6.5~7.5に調整し、さらに脱イオン水4.9mlを加えることにより最終濃度が10mg/mlの化合物 (VII-a-1) [式 (VII-a) 中、R¹がナトリウムである化合物] を10ml得た。

バチルス・ラテロスポラス(Bacillus laterosporus) ATCC4517株、バチルス・バディウス(Bacillus badius) ATCC14574 株、バチルス・ブレビス(Bacillus brevis) NRRL B-8029株、バチルス・エスピー(Bacillus sp.) PV-6 株、バチルス・エスピー(Bacillus sp.) PV-7株をそれぞれ寒天培地 [ペプトン (極東製薬工業製) 1%、肉エキス (極東製薬工業製) 0.7%、NaCl (ナカライテスク社製) 0.3%、バクトアガー (ディフコ社製) 2%、1N水酸化ナトリウムでpH 7.2に調整] に塗布し、30℃で24時間培養した。寒天培地上に生育した菌株各々ー白金耳をpH 7.5に調整したC培地 [グルコース (ナカライテスク社製) 2%、肉エキス (極東製薬工業製) 1%、イーストエキストラクト (オリエンタル酵母社製) 1%、ペプトン (極東製薬工業製) 0.1%] 3mlを含むA-スピッチ管に植菌し、30℃で24時間振とう培養した。培養後の培養液0.06mlを、pH 7.5に調整したC培地3ml を含む15ml A-スピッチ管 (16.5×115mm、井内盛栄堂製) に植菌し30℃で振とう培養した。24時間培養後、上記で得られた化合物 (VII-a-1) を最終濃度0.2mg/mlになるようにそれぞれのA-スピッチ管に添加し、添加後24時間目と72時間目にグルコースをそれぞれ最終濃度1%になるように添加して計120時間反応を行なった。

反応終了後、反応液を酢酸 (ナカライテスク社製) でpH 4に調整した。この反応液1mlに酢酸エチル (ナカライテスク社製) 2mlを加え、1時間振とうした。振とう後、遠心分離機 (日立工機製05P-21型) を用いて3000rpm、5分間遠心分離して上清の酢酸エチル層を回収し、遠心エバポレーター (トミー精工社製CC-101型) で溶媒を除去した後、残渣をメタノール1mlに溶解した。このメタノール溶液の一部を用いてHPLC分析 [カラム; Inertsil ODS-2 (5 μ m, 4×250mm, ジーエル

サイエンス社製)、カラム温度; 60℃、移動相; アセトニトリル: 水: リン酸 = 55: 45: 0.05、流速: 0.9ml/分、検出波長; 237nm]を行った結果、そのリテンションタイムから化合物(VIII-a-1) [式(VIII-a) 中、R¹がナトリウムである化合物] の生成が確認された。本条件において、化合物(VII-a-1) のリテンションタイムは2. 36分、化合物(VIII-a-1) のリテンションタイムは6. 51分である。実験に用いた全ての菌株で化合物(VIII-a-1) に相当するピークが認められ、例えばバチルス・ブレビス (*Bacillus brevis*) NRRL B-8029株による反応生成物は、2. 36分と6. 47分にピークを認めた。

得られた化合物(VIII-a-1) の量は、バチルス・ラテロスポラス (*Bacillus laterosporus*) ATCC4517株を用いた場合16. 8mg/l、バチルス・バディウス (*Bacillus badius*) ATCC14574 株を用いた場合10. 3mg/l、バチルス・ブレビス (*Bacillus brevis*) NRRL B-8029株を用いた場合1. 4mg/l、バチルス・エスピー (*Bacillus* sp.) PV-6株を用いた場合7. 3mg/l、バチルス・エスピー (*Bacillus* sp.) PV-7株を用いた場合42. 0mg/lであった。

実施例2

バチルス・エスピー (*Bacillus* sp.) PV-7株を実施例1と同様の寒天培地に塗布し、30℃で24時間培養し、寒天培地上に生育した菌株を一白金耳をとり、pH 7.5に調整したC培地3mlを含む15ml A-スピッチ管(16.5×115mm、井内盛栄堂製)2本に植菌して30℃で24時間振とう培養した。培養後の培養液0.06mlを、pH 7.5に調整したC培地3mlを含む15ml A-スピッチ管60本各々に植菌し、30℃で振とうしながら培養を行なった。培養開始後24時間目に、実施例1と同様にして得られた化合物(VII-a-1)を最終濃度0.4mg/mlになるように添加し、培養開始後24時間目と72時間目にそれぞれグルコースを最終濃度1%になるように添加し、計120時間培養を行った。培養終了後、培養液を3000rpm、4℃で10分間遠心分離し上清を分取した。この上清のpHを酢酸を用いて4.0に調整し、360mlの酢酸エチルを添加して30℃で1時間振とうした。振とう後、静置して上清を回収し、この上清に脱イオン水90mlを添加して30℃で30分振とうして再度上清を回収した。この上清に飽和食塩水90mlを添加し30℃で30分振とうして上清を回収した。

次に、この上清に無水 Na_2SO_4 を4.5g添加して室温で15分間放置して脱水した後、減圧下乾固した。得られた残査を脱イオン水5mlに溶解して水酸化ナトリウムでpHを9.0に調整し、100mlのHP-20カラム(35×100mm、三菱化学製)に通塔した。カラムは300mlの脱イオン水で洗浄した後、45%のアセトン水溶液120mlで溶出した。分取した画分はHPLC分析[分析カラム;Inertsil ODS-2(5 μm , 4×250mm, ジーエルサイエンス社製)、カラム温度;60℃、移動相;アセトニトリル:水:リン酸=55:45:0.05、流速:0.9ml/分、検出波長;237nm]を行い、化合物(VIII-a-1)を含む画分を回収した。この画分を減圧下でアセトニトリルを除去した後、pHを酢酸を用いて4.0に調整し、360mlの酢酸エチルを添加して30℃で1時間振とうした。振とう後、静置して上清を回収し、この上清に脱イオン水90mlを添加して30℃で30分振とうして再度上清を回収した。この上清に飽和食塩水90mlを添加し30℃で30分振とうして上清を回収した。

次にこの上清に無水 Na_2SO_4 4.5gを添加して室温で15分保持して脱水して減圧下乾固し、得られた残査をジクロロメタンに溶解し、1%のトリフルオロ酢酸を加えてラクトン化した後、分取用HPLC[カラム;Develosil ODS-HG-5(20×250mm、野村化学製)、カラム温度;40℃、溶媒;55%メタノール、流量;20ml/分、検出波長;237nm]を用いて精製を行なった結果、化合物(VIII-b)が5.1mg得られた。

得られた化合物(VIII-b)のマスマスペクトルおよび ^1H -NMRスペクトル分析の結果は以下の通りである。

マスマスペクトル

日本電子製JMS-HX/HX110A質量分析計を用い、マトリックスにm-ニトロベンジルアルコールを使用してポジティブモードで測定した。その結果、m/z 407に擬似分子イオンピーク($[\text{M}+\text{H}]^+$)を与え、化合物(VIII-b)の構造および分子量(406)から期待される数値に一致した。

^1H -NMR スペクトル

日本電子製JNM- α 400型スペクトロメータを用い、重クロロホルム中、内部標準にTMSを使用し400MHzで測定した。その結果を以下に示す。このスペクトルデ

ータは化合物 (VIII-b) の公知のデータ [三共研究所年報, 37, 147(1985)]と一致した。

δ ppm(CDC1₃) : 6.01(1H, d, J=9.5Hz), 5.89(1H, dd, J=9.5, 5.9Hz), 5.58(1H, m), 5.41(1H, m), 4.60(1H, dddd, J=10.6, 7.3, 5.4, 2.8Hz), 4.40(1H, m), 4.38(1H, m), 2.74(1H, dd, J=17.6, 5.1Hz), 2.61(1H, ddd, J=17.6, 3.7, 1.5Hz), 2.59(1H, dddd, J=13.1, 6.0, 4.8, 1.5Hz), 2.40(1H, m), 2.36(1H, m), 2.34(1H, m), 1.95(1H, dddd, J=14.4, 3.7, 2.9, 1.7Hz), 1.86(1H, dddd, J=12.5, 12.3, 7.3, 4.3Hz), 1.69(1H, m), 1.68(1H, m), 1.64(1H, m), 1.57(1H, m), 1.5~1.4(2H, m), 1.43(1H, m), 1.30(1H, m), 1.12(3H, d, J=6.8Hz), 0.91(3H, d, J=7.1Hz), 0.89(3H, t, J=7.4Hz)

実施例 3

実施例 1 と同様にして、化合物 (VII-a-1) [式 (VII-a) 中、R¹がナトリウムである化合物] を得た。

バチルス・アルベイ (Bacillus alvei) ATCC6344株、バチルス・サーキュランス (Bacillus circulans) NTCT-2610株、バチルス・マセランス (Bacillus macerans) NCIB-9368株、バチルス・メガテリウム (Bacillus megaterium) ATCC10778株、バチルス・メガテリウム (Bacillus megaterium) ATCC11562株、バチルス・メガテリウム (Bacillus megaterium) ATCC13402株、バチルス・メガテリウム (Bacillus megaterium) ATCC15177 株、バチルス・メガテリウム (Bacillus megaterium) ATCC15450株、バチルス・メガテリウム (Bacillus megaterium) ATCC19213株、バチルス・メガテリウム (Bacillus megaterium) IAM1032株、バチルス・プミルス (Bacillus pumilus) FERM BP-2064 株、バチルス・サチルス (Bacillus subtilis) ATCC6051株をそれぞれ寒天培地 [ペプトン (極東製薬工業製) 1%、肉エキス (極東製薬工業製) 0.7%、NaCl (ナカライテスク社製) 0.3%、バクトアガー (ディフコ社製) 2%、1N水酸化ナトリウムでpH 7.2に調整] に塗布し、30℃で24時間培養した。寒天培地上に生育した菌株各々ー白金耳をpH 7.4に調整したLBG培地 [グルコース (ナカライテスク社製) 2%、バクトトリプトン (ディフコ社製) 1%、イーストエキストラクト (ディ

フコ社製) 0.5%、NaCl (ナカライテスク社製) 0.5%] 3mlを含む試験管(13×165mm)に植菌し、30℃で24時間振とう培養した。培養後の培養液0.2mlを、pH 7.4に調整したLBGCa培地 [グルコース (ナカライテスク社製) 2%、バクトトリプトン (ディフコ社製) 1%、イーストエキストラクト (ディフコ社製) 0.5%、NaCl (ナカライテスク社製) 0.5%、炭酸カルシウム (国産化学社製) 0.5%] 10mlを含む試験管 (21×200mm) に植菌し30℃で振とう培養した。24時間培養後、培養液1mlを13ml容ポリプロピレンチューブ (SARSTEDT社製、輸入元アシスト社、No. 60 540S) にとり、化合物 (VII-a-1) を最終濃度0.2mg/ml、グルコースを最終濃度1%になるようにそれぞれ添加して48時間反応を行なった。

反応終了後、反応液を酢酸 (ナカライテスク社製) でpH 4に調整した。この反応液1mlに酢酸エチル (ナカライテスク社製) 2mlを加え、1時間振とうした。振とう後、遠心分離機 (日立工機製05P-21型) を用いて3000rpm、5分間遠心分離して上清の酢酸エチル層を回収し、遠心エバポレーター (トミー精工社製CC-101型) で溶媒を除去した後、残渣をメタノール1mlに溶解した。このメタノール溶液の一部を用いてHPLC分析 [カラム; Inertsil ODS-2 (5 μ m, 4×250mm, ジーエルサイエンス社製)、カラム温度; 60℃、移動相; アセトニトリル : 水 : リン酸 = 55 : 45 : 0.05、流速 : 0.9ml/分、検出波長; 237nm] を行った結果、そのリテンションタイムから化合物 (VIII-a-1) [式 (VIII-a) 中、R¹がナトリウムである化合物] の生成が確認された。

得られた化合物 (VIII-a-1) の量はバチルス・アルベイ (Bacillus alvei) ATCC6344 株を用いた場合0.18mg/l、バチルス・サーキュランス (Bacillus circulans) NTCT-2610株を用いた場合0.18mg/l、バチルス・マセランス (Bacillus macerans) NCIB-9368株を用いた場合0.32mg/l、バチルス・メガテリウム (Bacillus megaterium) ATCC10778株を用いた場合8.4mg/l、バチルス・メガテリウム (Bacillus megaterium) ATCC11562株を用いた場合0.31mg/l、バチルス・メガテリウム (Bacillus megaterium) ATCC13402株を用いた場合1.30mg/l、バチルス・メガテリウム (Bacillus megaterium) ATCC15177株を用いた場合1.60mg/l、バチルス・メガテリウム (Bacillus megaterium) ATCC15450株を用い

た場合0.58mg/l、バチルス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*) ATCC19213株を用いた場合0.16mg/l、バチルス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*) IAM1032株を用いた場合9.20mg/l、バチルス・プミルス (*Bacillus pumilus*) FERM BP-2064株を用いた場合0.17mg/l、バチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) ATCC6051株を用いた場合1.11mg/lであった。

実施例 4

バチルス・ラテロスポラス (*Bacillus laterosporus*) ATCC4517株を実施例 1 と同様の寒天培地に塗布し、30℃で24時間培養し、寒天培地上に生育した菌株を一白金耳をとり、pH 7.5に調整したC培地3mlを含む15ml A-スピッチ管 (16.5 × 115mm、井内盛栄堂製) 2本に植菌して30℃で24時間振とう培養した。培養後の培養液0.06mlを、pH 7.5に調整したC培地3mlを含む15ml A-スピッチ管60本各々に植菌し、30℃で振とうしながら培養を行なった。培養開始後24時間目に、実施例 1 と同様にして得られた化合物 (VII-a-1) を最終濃度0.4mg/mlになるように添加し、培養開始後24時間目と72時間目にそれぞれグルコースを最終濃度1%になるように添加し、計120時間振とうしながら培養を行った。培養終了後、培養液を3000rpm、4℃で10分間遠心分離し上清を分取した。この上清のpHを1N 塩酸を用いて3.0に調整し、360mlの酢酸エチルを添加して振とうした後、静置して上清を回収する操作を3回行った。この上清に脱イオン水90mlを添加して振とうした後、上清を回収した。この上清に飽和食塩水90mlを添加して振とうした後、上清を回収した。

次に、この上清に無水Na₂SO₄を4.5g添加して室温で15分間放置して脱水した後、減圧下乾固した。得られた残査を脱イオン水5mlに溶解して水酸化ナトリウムでpHを9.0に調整し、50mlのHP-20カラム (25 × 100mm、三菱化学製) に通塔した。カラムは150mlの脱イオン水で洗浄した後、アセトン含量20%、30%、40%のアセトン水溶液100mlで段階的に溶出した。分取した画分はHPLC分析 [分析カラム; Inertsil ODS-2 (5 μm, 4 × 250mm, ジーエルサイエンス社製)、カラム温度; 60℃、移動相; アセトニトリル : 水 : リン酸 = 55 : 45 : 0.05、流速 :

0.9ml/分、 b 検出波長;237nm]を行い、リテンションタイムから化合物(VIII-a-1)を含む画分を回収した。この画分を減圧下でアセトニトリルを除去した後、pHを1N塩酸を用いて3.0に調整し、360mlの酢酸エチルを添加して振とうした。振とう後、静置して上清を回収し、この上清に脱イオン水90mlを添加して振とうして再度上清を回収した。この上清に飽和食塩水90mlを添加し振とうして上清を回収した。

次にこの上清に無水 Na_2SO_4 4.5gを添加して室温で15分間保持して脱水して減圧乾固し、得られた残査をジクロルメタンに溶解し、1%のトリフルオロ酢酸を加えてラクトン化した後、分取用TLC [シリカゲル板; No. 1.05744(200×200mm, 0.5mm厚)MERCK社製、展開溶媒;酢酸エチル、発色液;12.5%リンモリブデン酸・1%硫酸セリウム/10%硫酸溶液]を用いて精製を行なった結果、化合物(VIII-b)が0.8mg得られた。得られた化合物(VIII-b)のマススペクトルおよび ^1H -NMRスペクトル分析の結果は以下の通りである。

マススペクトル

日本電子製JMS-HX/HX110A質量分析計を用い、マトリックスにm-ニトロベンジルアルコールを使用してポジティブモードで測定した。その結果、 m/z 407に擬似分子イオンピーク($[\text{M}+\text{H}]^+$)を与え、化合物(VIII-b)の構造および分子量(406)から期待される数値に一致した。

また、高分解能FAB MS測定の結果、 m/z 407.2440に擬似分子イオンピーク($[\text{M}+\text{H}]^+$)を与え、化合物の分子式($\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_6$)から期待される計算値(m/z 407.2434: $\text{C}_{23}\text{H}_{35}\text{O}_6$)に測定誤差範囲内で一致した。

^1H -NMRスペクトル

日本電子製JNM-LA300型核磁気共鳴装置を用い、重クロロホルム中、内部標準にクロロホルム(δ 7.26ppm)を使用し、300MHzで測定した。その結果を以下に示す。このスペクトルデータは化合物(VIII-b)の公知のデータ[三共研究所年報, 37, 147(1985)]と一致した。

δ ppm(CDCl_3): 6.00(1H, d, $J=9.7\text{Hz}$), 5.90(1H, dd, $J=9.7, 5.7\text{Hz}$), 5.58(1H, m), 5.41(1H, m), 4.61(1H, dddd, $J=10.9, 7.8, 5.1, 2.9\text{Hz}$),

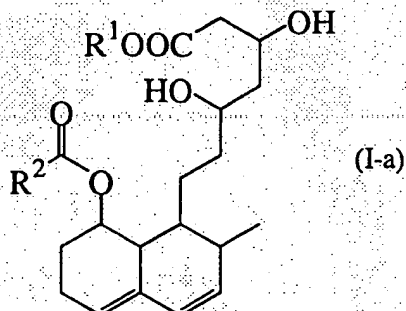
4.45-4.35(1H, m), 4.38(1H, dq, J=5.0, 3.9Hz), 2.73(1H, dd, J=17.6, 5.0Hz), 2.62(1H, ddd, J=17.6, 3.9, 1.7Hz), 2.59(1H, dddd, J=13.5, 6.6, 4.8, 1.6Hz), 2.45-2.35(1H, m), 2.36(1H, sex, J=6.9Hz), 2.40-2.30(1H, m), 1.95(1H, dddd, J=14.4, 3.9, 2.9, 1.7Hz), 1.90-1.80(1H, m), 1.75-1.60(1H, m), 1.68(1H, ddd, J=14.4, 10.9, 3.9Hz), 1.65(1H, dqu, J=13.6, 7.5Hz), 1.65-1.50(1H, m), 1.43(1H, dqu, J=13.6, 7Hz), 1.50-1.35(2H, m), 1.35-1.25(1H, m), 1.12(3H, d, J=7.0Hz), 0.91(3H, d, J=7.0Hz), 0.89(3H, t, J=7.4Hz)

産業上の利用可能性

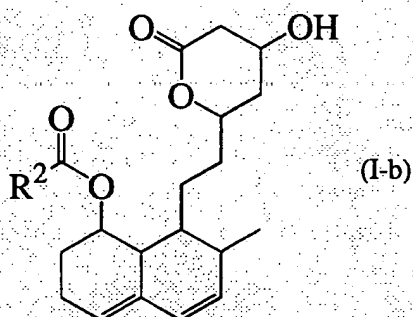
本発明によりHMG-C o Aレダクターゼを阻害し、血清コレステロールの低下作用等を有する化合物を効率よく製造することができる。

請求の範囲

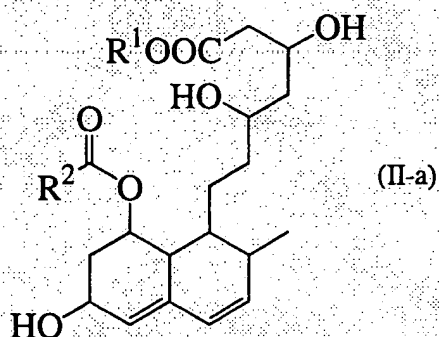
1. バチルス属に属する微生物由来でかつ、一般式 (I-a)



(式中、 R^1 は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表し、 R^2 は置換もしくは非置換のアルキルまたはアリアルを表す) で表される化合物 [以下、化合物 (I-a) という] または一般式 (I-b)

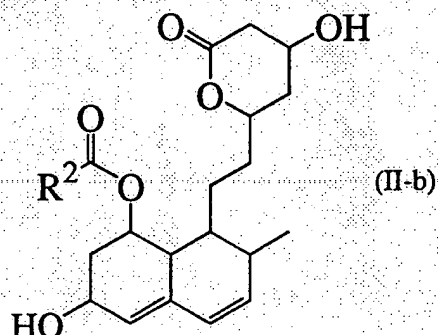


(式中、 R^2 は置換もしくは非置換のアルキルまたはアリアルを表す) で表される、化合物 (I-a) の閉鎖ラクトン体 [以下、化合物 (I-b) という] から、一般式 (II-a)



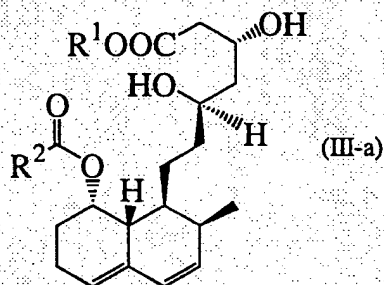
(式中、 R^1 は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表し、 R^2 は置換もしくは非置換のアルキルまたはアリアルを表す) で表される

化合物 [以下、化合物 (II-a) という] または一般式 (II-b)

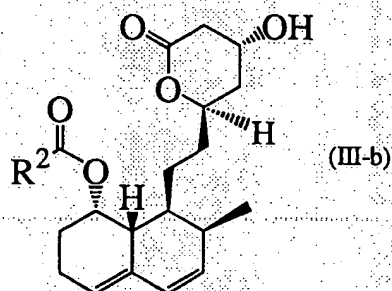


(式中、R²は置換もしくは非置換のアルキルまたはアリールを表す)で表される、化合物 (II-a) の閉鎖ラクトン体 [以下、化合物 (II-b) という] を生成する活性を有する酵素源を、化合物 (I-a) または化合物 (I-b) に反応液中で作用させ、反応液中に化合物 (II-a) または化合物 (II-b) を生成させ、該反応液から化合物 (II-a) または化合物 (II-b) を採取することを特徴とする化合物 (II-a) または化合物 (II-b) の製造法。

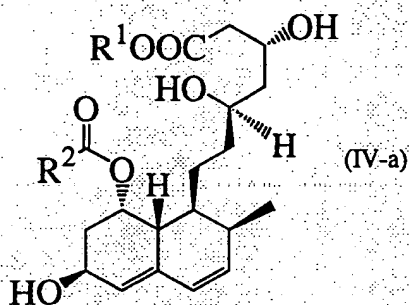
2. 化合物 (I-a) が一般式 (III-a)



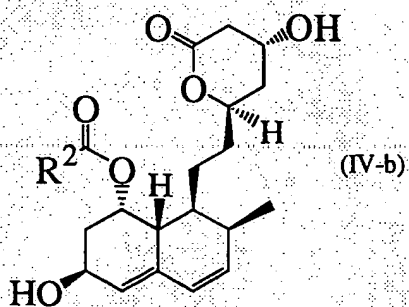
(式中、R¹は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表し、R²は置換もしくは非置換のアルキルまたはアリールを表す)で表される化合物 [以下、化合物 (III-a) という] であり、化合物 (I-b) が一般式 (III-b)



(式中、 R^2 は置換もしくは非置換のアルキルまたはアリールを表す)で表される化合物〔以下、化合物 (III-b) という〕であり、化合物 (II-a) が一般式 (IV-a)

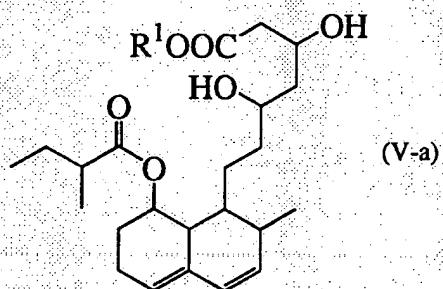


(式中、 R^1 は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表す)で表される化合物〔以下、化合物 (IV-a) という〕であり、化合物 (II-b) が一般式 (IV-b)

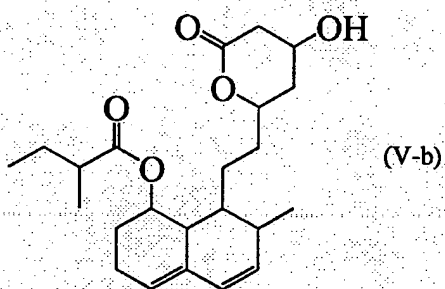


(式中、 R^2 は置換もしくは非置換のアルキルまたはアリールを表す)で表される化合物〔以下、化合物 (IV-b) という〕である請求の範囲1記載の製造法。

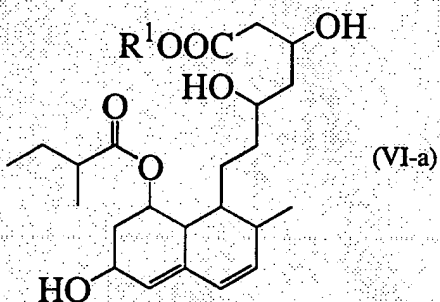
3. 化合物 (I-a) が一般式 (V-a)



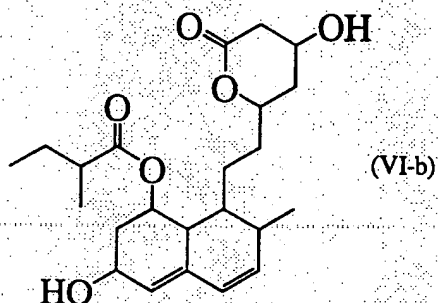
(式中、R¹は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表す)で表される化合物〔以下、化合物(V-a)という〕であり、化合物(I-b)が一般式(V-b)



で表される化合物〔以下、化合物(V-b)という〕であり、化合物(II-a)が一般式(VI-a)

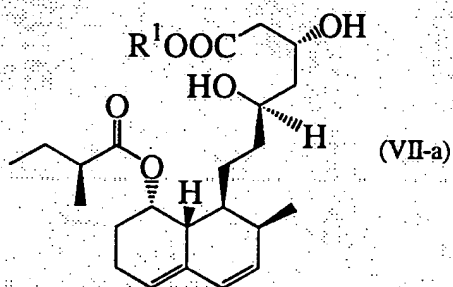


(式中、R¹は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表す)で表される化合物〔以下、化合物(VI-a)という〕であり、化合物(II-b)が一般式(VI-b)

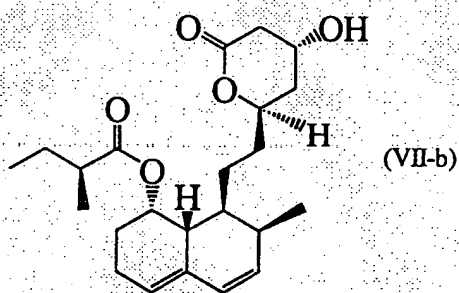


で表される化合物〔以下、化合物 (VI-b) という〕である請求の範囲 1 記載の製造法。

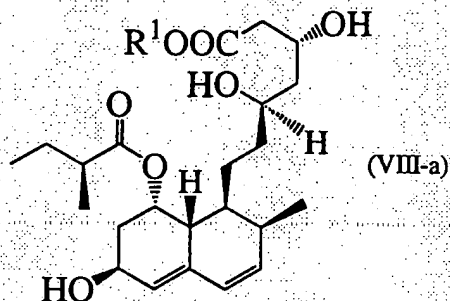
4. 化合物 (I-a) が一般式 (VII-a)



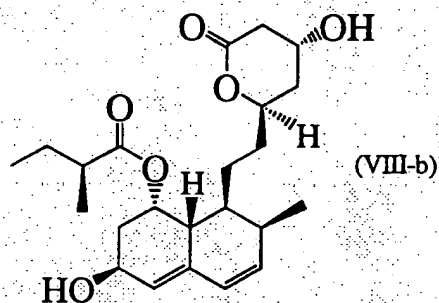
(式中、R¹は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表す) で表される化合物〔以下、化合物 (VII-a) という〕であり、化合物 (I-b) が一般式 (VII-b)



で表される化合物〔以下、化合物 (VII-b) という〕であり、化合物 (II-a) が一般式 (VIII-a)



(式中、 R^1 は水素原子、置換もしくは非置換のアルキルまたはアルカリ金属を表す)で表される化合物〔以下、化合物 (VIII-a) という〕であり、化合物 (II-b) が一般式 (VIII-b)



で表される化合物〔以下、化合物 (VIII-b) という〕である請求の範囲1記載の製造法。

5. 酵素源が、化合物 (I-a) または化合物 (I-b) から、化合物 (II-a) または化合物 (II-b) を生成する活性を有する微生物、該微生物の培養物もしくは菌体またはそれらの処理物、または該微生物から抽出した酵素である請求の範囲1記載の製造法。

6. 酵素源が、化合物 (III-a) または化合物 (III-b) から、化合物 (IV-a) または化合物 (IV-b) を生成する活性を有する微生物、該微生物の培養物もしくは菌体またはそれらの処理物、または該微生物から抽出した酵素である請求の範囲2記載の製造法。

7. 酵素源が、化合物 (V-a) または化合物 (V-b) から、化合物 (VI-a) または化合物 (VI-b) を生成する活性を有する微生物、該微生物の培養物もしくは菌体またはそれらの処理物、または該微生物から抽出した酵素である請求の範囲3記

載の製造法。

8. 酵素源が、化合物 (VII-a) または化合物 (VII-b) から、化合物(VIII-a) または化合物 (VIII-b) を生成する活性を有する微生物、該微生物の培養物もしくは菌体またはそれらの処理物、または該微生物から抽出した酵素である請求の範囲 4 記載の製造法。

9. バチルス属に属する微生物がバチルス・ラテロスポラス (Bacillus laterosporus)、バチルス・バディウス (Bacillus badius)、バチルス・ブレビス (Bacillus brevis)、バチルス・アルベイ (Bacillus alvei)、バチルス・サーキュランス (Bacillus circulans)、バチルス・マセランス (Bacillus macerans)、バチルス・メガテリウム (Bacillus megaterium)、バチルス・プミルス (Bacillus pumilus) またはバチルス・サチルス (Bacillus subtilis) に属する微生物である請求の範囲 1、2、3 または 4 記載の製造法。

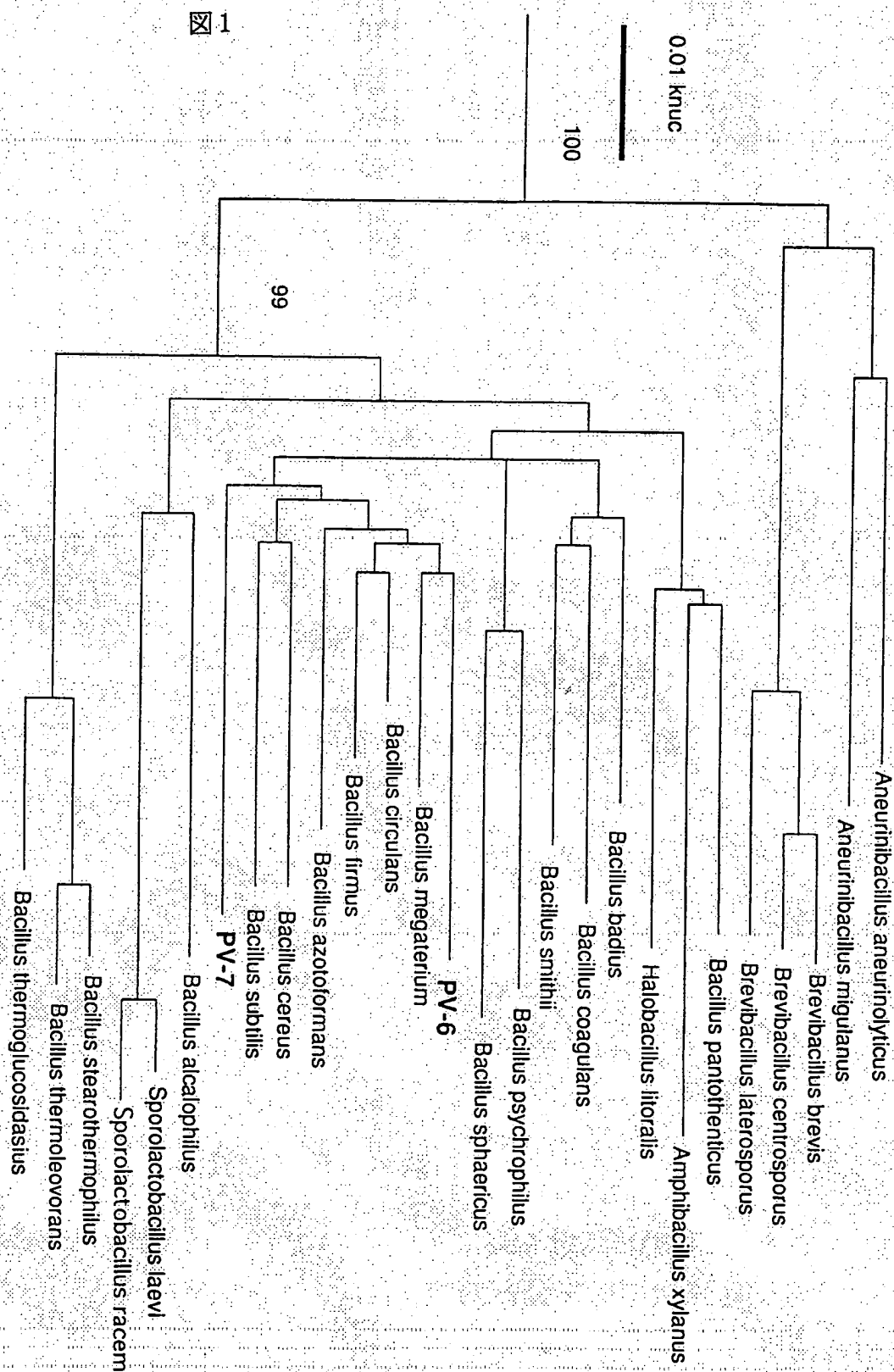
10. バチルス属に属する微生物が、バチルス・ラテロスポラス (Bacillus laterosporus) ATCC4517株、バチルス・バディウス (Bacillus badius) ATCC14574株、バチルス・ブレビス (Bacillus brevis) NRRL B-8029株、バチルス・アルベイ (Bacillus alvei) ATCC6344株、バチルス・サーキュランス (Bacillus circulans) NTCT-2610株、バチルス・マセランス (Bacillus macerans) NCIB-9368株、バチルス・メガテリウム (Bacillus megaterium) ATCC10778株、バチルス・メガテリウム (Bacillus megaterium) ATCC11562 株、バチルス・メガテリウム (Bacillus megaterium) ATCC13402株、バチルス・メガテリウム (Bacillus megaterium) ATCC15177株、バチルス・メガテリウム (Bacillus megaterium) ATCC15450 株、バチルス・メガテリウム (Bacillus megaterium) ATCC19213 株、バチルス・メガテリウム (Bacillus megaterium) IAM1032株、バチルス・プミルス (Bacillus pumilus) FERM BP-2064 株またはバチルス・サチルス (Bacillus subtilis) ATCC6051株である請求の範囲 1、2、3 または 4 記載の製造法。

11. バチルス属に属する微生物がバチルス・エスピー (Bacillus sp.) PV-6 株 (FERM BP-6029) またはバチルス・エスピー (Bacillus sp.) PV-7株 (FERM

BP-6030) である請求の範囲 1、2、3 または 4 記載の製造法。

- 1 2. バチルス・エスピー(Bacillus sp.) PV-6株 (FERM BP-6029)。
- 1 3. バチルス・エスピー(Bacillus sp.) PV-7株 (FERM BP-6030)。

1 / 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03396

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁶ C12P7/62, 17/06, C12N1/20

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁶ C12P7/62, 17/06, C12N1/20

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CA (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X | EP, 776974, A (Sankyo Co., Ltd.), 4 June, 1997 (04. 06. 97) & CA, 2191503, A | 1-8 |
| A, P | WO, 98/06867, A (YOUNG JIN PHARMACEUTICAL IND. CO., LTD.), 19 February, 1998 (19. 02. 98) (Family: none) | 1-13 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

| | |
|---|--|
| * Special categories of cited documents: | "I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "E" earlier document but published on or after the international filing date | "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "&" document member of the same patent family |
| "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | |
| "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | |

Date of the actual completion of the international search
27 August, 1998 (27. 08. 98)

Date of mailing of the international search report
8 September, 1998 (08. 09. 98)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 98/03396

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁸ C12P7/62, 17/06, C12N1/20

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl⁸ C12P7/62, 17/06, C12N1/20

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
CA (STN)
REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|------------------|
| X | EP, 776974, A (三共株式会社) 4. 6月. 1997 (04. 06. 97) & CA, 2191503, A | 1-8 |
| A, P | WO, 98/06867, A (YOUNG JIN PHARMACEUTICAL IND. CO., LTD.) 19. 2月. 1998 (19. 02. 98) ファミリーなし | 1-13 |

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
27. 08. 98

国際調査報告の発送日

08.09.98

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

吉住 和之

4 B 9165

電話番号 03-3581-1101 内線 3449